

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT: YOUNG HOON PARK ET AL.)
)
SERIAL NO.: 10/815,882)
)
FILED: MARCH 31, 2004)
)
FOR: METHOD OF PRODUCING 1, 2-PROPANEDIOL)
USING KLEBSIELLA PNEUMONIAE)

CLAIM FOR PRIORITY

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Commissioner:

Enclosed herewith is a certified copy of Korean Patent Application No. 2003-0020734 filed on April 2, 2003. The enclosed Application is directed to the invention disclosed and claimed in the above-identified application.

Applicants hereby claim the benefit of the filing date of April 2, 2003, of the Korean Patent Application No. 2003-0020734, under provisions of 35 U.S.C. 119 and the International Convention for the protection of Industrial Property.

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service via First Class Mail in an envelope addressed to United States Patent and Trademark Office, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on:

April 14, 2004
(Date of Deposit)

Tammie Lanthier
(Name of Person Mailing Correspondence)

Tammie Lanthier
(Signature)

4-14-04
(Date)

Respectfully submitted,

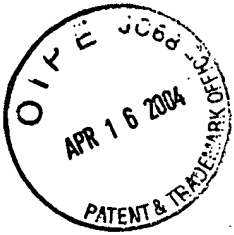
CANTOR COLBURN LLP

By:

Soonja Bae

Soonja Bae
Reg. No. (See Attached)
Cantor Colburn LLP
55 Griffin Road South
Bloomfield, CT 06002
PTO Customer No. 23413
Telephone: (860) 286-2929
Fax: (860) 286-0115

Date: April 14, 2004



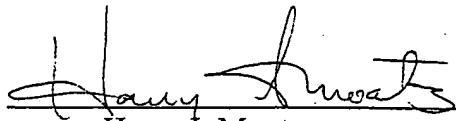
**BEFORE THE OFFICE OF ENROLLMENT AND DISCIPLINE
UNITED STATE PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

LIMITED RECOGNITION UNDER 37 CFR § 10.9(b)

Soonja Bae is hereby given limited recognition under 37 CFR § 10.9(b) as an employee of Cantor Colburn LLP to prepare and prosecute patent applications wherein the patent applicant is the client of Cantor Colburn LLP, and the attorney or agent of record in the applications is a registered practitioner who is a member of Cantor Colburn LLP. This limited recognition shall expire on the date appearing below, or when whichever of the following events first occurs prior to the date appearing below: (i) Soonja Bae ceases to lawfully reside in the United States, (ii) Soonja Bae's employment with Cantor Colburn LLP ceases or is terminated, or (iii) Soonja Bae ceases to remain or reside in the United States on an H-1 visa.

This document constitutes proof of such recognition. The original of this document is on file in the Office of Enrollment and Discipline of the U.S. Patent and Trademark Office.

Expires: August 4, 2004



Harry F. Moatz
Director of Enrollment and Discipline



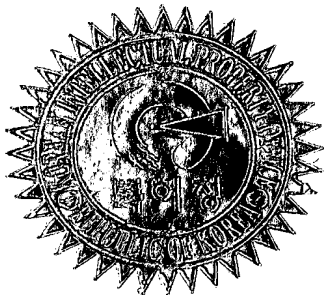
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0020734
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 04월 02일
Date of Application APR 02, 2003

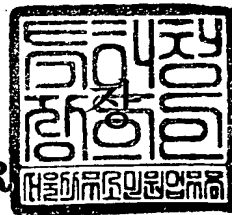
출원인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.



2004 년 03 월 29 일

특 허 청

COMMISSIONER





1020030020734

출력 일자: 2004/3/30

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2003.04.02
【국제특허분류】	C12P
【발명의 명칭】	클렘시엘라 뉴모니아를 이용한 1,2-프로판디올의 생산방법
【발명의 영문명칭】	A method for producing a 1,2-propanediol using Klebsiella pneumoniae
【출원인】	
【명칭】	씨제이 주식회사
【출원인코드】	1-1998-003466-9
【대리인】	
【성명】	이영필
【대리인코드】	9-1998-000334-6
【포괄위임등록번호】	2000-021089-8
【대리인】	
【성명】	이태호
【대리인코드】	9-1998-000335-2
【포괄위임등록번호】	2002-008457-9
【대리인】	
【성명】	오국진
【대리인코드】	9-1999-000562-6
【포괄위임등록번호】	2002-049689-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박영훈
【성명의 영문표기】	PARK, Young Hoon
【주민등록번호】	511229-1010425
【우편번호】	463-703
【주소】	경기도 성남시 분당구 구미동 무지개 대림아파트 111동 102호
【국적】	KR



1020030020734

출력 일자: 2004/3/30

【발명자】

【성명의 국문표기】

정진수

【성명의 영문표기】

CHUNG, Jin Su

【주민등록번호】

720304-1117514

【우편번호】

449-912

【주소】

경기도 용인시 구성면 마북리 연원마을 벽산아파트 101동 803호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

조광명

【성명의 영문표기】

CHO, Kwang Myung

【주민등록번호】

690823-1345331

【우편번호】

467-866

【주소】

경기도 이천시 부발읍 아미리 753 현대아파트 707동 1603호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

강성욱

【성명의 영문표기】

KANG, Seong Uk

【주민등록번호】

740504-1246920

【우편번호】

449-709

【주소】

경기도 용인시 김량장동 현대아파트 105동 602호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

엄혜원

【성명의 영문표기】

UM, Hye Won

【주민등록번호】

740922-2057517

【우편번호】

442-370

【주소】

경기도 수원시 팔달구 매탄동 주공그린빌아파트 101동 1001호

【국적】

KR

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
이영필 (인) 대리인
이태호 (인) 대리인
오국진 (인)

【수수료】

【기본출원료】	10	면	29,000	원
---------	----	---	--------	---

【가산출원료】	0	면	0	원
---------	---	---	---	---

【우선권주장료】	0	건	0	원
----------	---	---	---	---

【심사청구료】	0	항	0	원
---------	---	---	---	---

【합계】	29,000	원		
------	--------	---	--	--

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 1,2-프로판디올의 생산방법에 관한 것으로, 구체적으로는 (a) 6-데옥시헥소스당이 아닌 당 탄소원을 포함하는 배지에서 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)를 호기적 조건에서 배양하는 단계 및 (b) 상기 배양물로부터 1,2-프로판디올을 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 1,2-프로판디올의 생산 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 상대적으로 값싼 당 탄소원을 포함하는 배지를 사용하여 높은 효율로 1,2-프로판디올을 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)로부터 생산할 수 있다.

【색인어】

클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*), 포도당, 1,2-프로판디올

【명세서】

【발명의 명칭】

클렙시엘라 뉴모니아를 이용한 1,2-프로판디올의 생산방법 {A method for producing a 1,2-propanediol using *Klebsiella pneumoniae*}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <1> 본 발명은 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)를 이용한 1,2-프로판디올의 생산방법에 관한 것이다.
- <2> 1,2-프로판디올(1,2-propanediol)은 의약품, 농약, 부동액 및 생리활성 물질과 같은 광학 활성을 갖는 화합물의 제조 과정에서, 중간체로서 매우 유용하고 중요하다.
- <3> 종래에 1,2-프로판디올을 생산하는 방법에 있어서, 화학적 합성 경로가 알려져 있다. 1,2-프로판디올은 프로필렌으로부터 얻어지는 프로필렌 옥사이드의 수소화 과정을 통해서 생산된다. 이러한 생산방식을 통해 1,2-프로판디올을 생산하는 경우, 폴리글리콜의 생성을 최소화하기 위해서 다량의 물을 사용하여야 한다. 또한 1,2-프로판디올의 생산을 위해서는 프로필렌 옥사이드의 합성이 필요한데, 프로필렌 옥사이드의 합성과정상에 비싼 화학적 촉매를 사용해야 하며, 환경오염을 유발할 수 있는 클로로히드린, 크롤린과 같은 다량의 부산물이 생성된다. 이러한 화학적 촉매와 부산물은 1,2-프로판디올의 화학적 합성 방법의 가장 큰 단점이다.
- <4> 1,2-프로판디올의 생물학적 생산 방법이 또한 알려져 있다. 대장균과 여러 다른 미생물에서 L-람노즈(rhamnose)와 L-푸코즈(fucose)를 이용하여 생산하는 방식이 알려져 있다. 그러

나, 상기 방식은 람노즈와 푸코즈가 매우 고가이기 때문에 경제적이지 못하다. Cameron 등은 HG-8(ATCC 31960)(Biotechnol. Prog. 2001,17, 52~56)을 이용하여 포도당으로부터 1,2-프로판디올을 생산할 수 있는 방법을 개시하였다. 또한, Cameron 등의 미국특허 제6,303,352호는 재조합 대장균을 이용하여 포도당으로부터 1,2-프로판디올을 생산하는 방법을 개시하였다.

<5> 그러나, 이들 종래 기술은 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 이외의 균주를 사용하고 있다. 종래 클렙시엘라 뉴모니아 균주를 람노즈 및 푸코즈와 같은 6-데옥시헥소스를 포함하는 배지에서 혐기적 조건에서 배양하는 경우, 1,2-프로판디올의 생산량이 증가하는 것이 보고된 바 있다. 그러나, 포도당을 사용하는 경우, 호기적 조건 및 혐기적 조건에 배양하였을 때, 1,2-프로판디올이 생산된다는 것이 보고된 바 있으나, 그 수율이 매우 낮아 상업화하기 곤란한 문제점이 있다 (Juan Aguilar 등, J. Bact. Jan. 1985, 435~437).

<6> 이에, 본 발명자들은 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)로부터 람노즈 및 푸코즈와 같은 6-데옥시헥소스와 같은 고가의 당 탄소원을 사용하지 않으면서도, 1,2-프로판디올을 고효율로 생산할 수 있는 방법을 집중적으로 연구한 결과, 포도당과 같은 통상의 당 탄소원을 과량 포함하는 배지에서 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)를 호기적으로 배양하는 경우, 1,2-프로판디올이 고효율로 생산된다는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<7> 따라서, 본 발명의 목적은 통상의 당 탄소원을 포함하는 배지에서 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)를 호기적 조건에서 배양하여 1,2-프로판디올을 고효율로 생산할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <8> 본 발명은 (a) 6-데옥시헥소즈 당이 아닌 당 탄소원을 포함하는 배지에서 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)를 호기적 조건에서 배양하는 단계 및
- <9> (b) 상기 배양물로부터 1,2-프로판디올을 분리하는 단계를 포함하는 1,2-프로판디올의 생산방법을 제공한다. 상기 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)는 바람직하기로는, 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae* : ATCC 25955)이다. 1,2-프로판디올의 분리는 예를 들면, 이온교환크로마토그래피, HPLC 및 결정화와 같은 당업계에 알려진 통상적인 방법을 이용하여 이루어질 수 있다.
- <10> 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 상기 배지는 대사 중간체 유기산을 더 포함할 수 있다. 상기 대사 중간체 유기산은 피루베이트, 푸마레이트, 시트레이트 및 석시네이트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 이러한 상기 대사 중간체 유기산은 배양 초기에 배지에 첨가하여 회분식으로 배양되는 것뿐만 아니라, 배양 중간에 배지 중에 도입하여 유가식 또는 연속식으로 배양될 수도 있다.
- <11> 본 발명에 있어서, 상기 당 탄소원은 아라비노즈, 과당, 갈락토즈, 포도당, 유당, 맥아당, 설탕, 자일로즈 및 그들의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것과 같은 용이하게 이용가능한 당을 말하는 것이나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 당 탄소원으로부터 제외되는 것은 람노즈(rhamnose)와 푸코즈(fucose)와 같은 6-데옥시헥소즈 당이다. 바람직하기로는, 상기 당 탄소원은 포도당이다.
- <12> 본 발명에 있어서, 상기 당 탄소원의 배지 중 함량은 세포 대사 속도의 관점에서 일정기간 동안 과량으로 존재할 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 구체적으로, 약 10~30g/l, 바람직

하기로는 약 10~20g/l인 것이다. 가장 바람직하기로는, 포도당 10~30g/l를 포함하는 것이다. 상기 당 탄소원의 배지 중 함량이 30g/l를 초과하는 경우, 1,2-프로판디올의 생산성이 높지 않고, 10g/l 미만인 경우도 또한, 1,2-프로판디올의 생산 수율이 높지 않다.

<13> 본 발명의 일 구체예에서, 상기 배지는 1L 당 Na_2HP_4 5~15g, KH_2PO_4 3~8g, NH_4Cl 0.5~4g, NaCl 2~7g, 효모 추출물 3~10g, MgSO_4 0.1~3 mmol 및 포도당 10~30g을 포함하는 것이 될 수 있다.

<14> 본 발명에 있어서, 상기 배양은 pH 5~8, 및 온도 30~37°C의 조건에서 이루어지는 것이 바람직하다. 또한, 배양 중 산소는 호기적 상태로 유지할 수 있는 정도로 공급하는 것이 바람직하며, 반응기 자체의 교반, 교반기를 통한 교반 또는 공기 주입과 같은 당업계에서 알려진 산소 공급 수단을 사용할 수 있다. 바람직하기로는, 상기 산소는 0~1 vvm 으로 공급되는 것이 바람직하다.

<15> 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<16> 실시예

<17> 실시예1: 1,2-프로판디올 생산을 위한 클렙시엘라 뉴모니아의 배양

<18> 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC 25955를 하기 조성을 갖는 1,2-프로판디올 생산용 배지에서 배양하였다. 상기 생산용 배지는 pH 6.8로서 1L 당 하기 표1의 조성을 갖는다.

<19> 표1. 1,2-프로판디올 생산용 배지 조성

<20>	성 분	1리터당 함량
	Na ₂ HPO ₄	10g
	KH ₂ PO ₄	5g
	NH ₄ Cl	2g
	NaCl	5g
	효모 추출물 (yeast extract)	1g
	MgSO ₄	1 mmol
	포도당	20g

<21> 상기 배지를 배플이 있는 플라스크(250ml)에 50ml 붓고 배지를 가압하여 121℃에서 15 분 동안 살균하였다. 포도당은 배지에 바로 첨가하지 않고, 별도로 살균하였다. 살균이 끝난 배지를 서로 혼합하여 완전한 1,2-프로판디올 생산용 배지를 제조하였다.

<22> 다음으로, 영양 한천(Nutrient Agar: NA) 플레이트에 미리 배양된 클렙시엘라 뉴모니아 ATCC 25955를 LB 브로쓰 20ml에 접종하여 200rpm에서 24시간 동안 배양하였다. 그 결과 배양된 브로쓰로부터 1ml을 취하여, 상기 1,2-프로판디올 생산용 배지에 접종하고 37℃에서, 200rpm 으로 24시간 동안 배양하였다.

<23> **실시예 2: 배양물 중의 1,2-프로판디올 측정**

<24> 상기 실시예1에서 얻어진 배양물 중의 1,2-프로판디올의 약을 측정하였다. 먼저, 상기 배양물을 1ml씩 1.5ml 튜브에 회수하고, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 다음으로, 상등액을 새로운 튜브로 옮기고, 멸균된 증류수를 첨가하여 5배 희석하였다. 희석된 샘플을 HPLC를 이용하여 생성된 1,2-프로판디올을 측정하였다.

<25> 그 결과를 하기 표2에 나타내었다. 표2에 나타낸 바와 같이, 1,2-프로판디올의 생산량은 3.838g/l로서 종래 알려진 값에 비하여 현저히 높음을 알 수 있다(Juan Aguilar 등, J. Bact. Jan. 1985, 435~437).

<26> 표2. 배양물 중의 1,2-프로판디올 농도

<27>	균주	잔류 포도당양(g/l)	1,2-프로판디올 (g/l)	균체량 (OD ₆₀₀)
	클렙시엘라 뉴모니아 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) ATCC 25955	0	3.838	6.54

<28> 실시예 3 : 대사 중간체 유기산 첨가에 따른 1,2-프로판디올 생산수율 향상

<29> 본 실시예에서는 대사 중간체 유기산인 푸마레이트가 1,2-프로판디올의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 이를 위하여 실시예1에 따른 1,2-프로판디올 생산용배지에 푸마레이트가 25mM/l의 양으로 첨가된 배지를 제조하였다. 상기 푸마레이트 첨가 배지에서, 클렙시엘라 뉴모니아 (*Klebsiella pneumoniae*) ATCC 25955를 실시예 1과 동일한 조건으로 배양하고, 실시예2와 동일한 조건으로 1,2-프로판디올의 농도를 측정하였다.

<30> 그 결과를 하기 표3에 나타내었다. 표3에 나타낸 바와 같이, 실시예1에 따른 1,2-프로판디올 생산용 배지를 사용한 경우에 비하여, 1,2-프로판디올의 생산량이 현저히 증가하였다.

<31> 표3. 푸마레이트가 첨가된 생산용 배지를 사용한 경우의 배양물 중 1,2-프로판디올 농도

<32>	푸마레이트 첨가 여부	잔류 포도당양(g/l)	1,2-프로판디올 (g/l)	균체량 (OD ₆₀₀)
	-	0	3.695	6.54
	+	0	5.988	8.05

<33> 이상과 같은 실시예의 결과로부터, 클렙시엘라 뉴모니아 (*Klebsiella pneumoniae*)를 과량의 당 탄소원을 포함하는 배지 중에서 호기성 조건하에 배양함으로써, 종래 보고된 바에 비하여 현저히 높은 효율로 1,2-프로판디올을 클렙시엘라 뉴모니아로부터 생산할 수 있음을 확인하였다. 또한, 1,2-프로판디올 생산용 배지에 대사 중간체 유기산을 첨가함으로써, 1,2-프로판디올의 생산 수율을 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

【발명의 효과】

<34> 본 발명의 1,2-프로판디올 생산 방법에 의하면, 상대적으로 값싼 당 탄소원을 포함하는 배지를 사용하여 높은 효율로 1,2-프로판디올을 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)로부터 생산할 수 있다.

<35> 또한, 본 발명에 의하면, 대사 중간체 유기산을 포함하는 배지를 사용함으로써, 1,2-프로판디올의 생산 효율을 더욱 증가시킬 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

(a) 6-데옥시헥소즈 당을 제외한 당 탄소원 10~30g/l를 포함하는 배지에서 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*)를 호기적 조건에서 배양하는 단계 및

(b) 상기 배양물로부터 1,2-프로판디올을 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 1,2-프로판디올의 생산 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 배지는 대사 중간체 유기산을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,2-프로판디올의 생산방법.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 대사 중간체 유기산은 피루베이트, 푸마레이트, 시트레이트 및 석시네이트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 1,2-프로판디올의 생산방법.

【청구항 4】

제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 있어서, 상기 당 탄소원은 아라비노즈, 과당, 갈락토즈, 포도당, 유당, 맥아당, 설탕, 자일로즈 및 그들의 조합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 1,2-프로판디올의 생산방법.

【청구항 5】

제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 있어서, 상기 배지는 1L 당 Na_2HP_4 5~15g, KH_2PO_4 3~8g, NH_4Cl 0.5~4g, NaCl 2~7g, 효모 추출물 3~10g, MgSO_4 0.1~3 mmol 및 포도당 10~30g을 포함하는 것을 특징으로 하는 1,2-프로판디올의 생산방법.

【청구항 6】

제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 있어서, 상기 배양은 pH 5~8, 및 온도 30~37℃에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 1,2-프로판디올의 생산방법.

【청구항 7】

제1항 내지 제3항 중 어느 한항에 있어서, 산소 공급 속도는 0~1 vvm 인 것을 특징으로 하는 1,2-프로판디올의 생산방법.